

学 位 論 文 要 旨

細胞の生育に関わる CARF の機能についての研究 (Study on cellular function of CARF (collaborator of ARF) that is involved in cell growth and proliferation)

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座
佐藤 慈子

CARF がどのように細胞増殖に関与し、がん化を抑制しているかの分子機構についてはいくつか仮説が提唱されているがまだ明らかになっていない。もし、CARF の細胞内における新しい役割を明らかにできれば、新たながん抑制メカニズムの解明や新規抗がん剤ターゲットの発見につながる可能性がある。CARF 欠損が p53 不活化細胞や p53 欠損細胞においてもアポトーシスと異常細胞分裂を誘導することから、CARF が関与する p53 非依存的細胞増殖調節機構が存在すると推論された。この p53 非依存的細胞増殖調節機構において CARF 相互作用因子が重要な役割を担うと考えられ、機能既知 CARF 相互作用因子：p53、MDM2、ARF、CHK2、ERK1 以外の CARF 相互作用因子が p53 非依存的細胞増殖調節機構解明の鍵となる可能性が考えられた。本研究では、CARF による p53 非依存的細胞増殖調節機構の分子メカニズムを明らかにする手がかりを得ることを目的とし、最新のプロテオーム解析技術を用いて新規 CARF 相互作用因子を探索することから研究を進めることとした。

FLAG タグタンパク質に対する pull down 法により CARF 相互作用因子群の単離を試み、その構成タンパク質を nano-LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析により同定した。その結果、5'-3'エキソリボヌクレアーゼ (XRN2) および他 18 種類の新規 CARF 相互作用タンパク質を同定した。同定した XRN2 と CARF の相互作用についてさらに調べた。作製した CARF 薬剤発現誘導細胞を用いた pull down において CARF の量依存的に CARF 相互作用因子群に含まれる XRN2 の量が増加した。また、XRN2 相互作用因子群に CARF が含まれることを明らかにした。双方向から相互作用を調べることで CARF と XRN2 が相互作用すること

を示した。また、CARFもXRN2もRNAと相互作用することが報告されていることから、RNAを介してCARFとXRN2が相互作用する可能性が考えられた。この可能性について調べ、RNAを介さずCARFとXRN2が相互作用することを明らかにした。さらに、mKGレポーターシステムを用いた解析からCARFとXRN2が細胞内、特に核質において直接相互作用すると結論づけた。両タンパク質について欠失変異体を作成し、各々タンパク質内の相互作用領域を調べた。CARFでは1-175 aaを介してXRN2と相互作用すること、XRN2では少なくとも1-151 aa、501-680 aaがCARFとの相互作用に必要なことが明らかになった。XRN2の生理機能の1つであるpre-rRNAプロセッシングにおけるXRN2の働きにCARFが影響を与えるのか調べた。始めにRNA干渉の技術を用いてXRN2をノックダウンし、5'ETS領域のpre-rRNAプロセッシングにおけるXRN2の働きをノザンプロット法により確認した。次に、CARFの一過的過剰発現および薬剤誘導による過剰発現細胞を用いてpre-rRNAプロセッシングへの影響を調べた。その結果、CARFの過剰発現により5'ETS領域のpre-rRNAプロセッシング過程において生成されるpre-rRNA fragments (5'ETS-pre-rRNA fragments)のXRN2による分解が阻害されることが示唆された。さらに、CARFの過剰発現により5'ETS領域の01 siteの切断におけるXRN2の働きが阻害されることが示唆された。一方で、CARFは01 siteの切断が起こらないと次のpre-rRNAプロセッシングへ進ませない監視をしているXRN2の働きに対しては関与していないと推論された。明らかになったCARFによるXRN2のpre-rRNAプロセッシングにおける働きの阻害がどのような機構によって起こるのか調べた。始めにXRN2の酵素活性に対するCARFによる影響を調べたが、影響はなかった。次にXRN2の発現量に対するCARFの影響を調べたが、影響はなかった。最後に、XRN2の細胞内局在に対する影響を細胞免疫染色法および細胞分画法を用いて調べた。その結果、CARFはXRN2を核質へ留め、リボソーム生合成の場である核小体の局在を減少させることで、5'ETS領域のpre-rRNAプロセッシングにおけるXRN2の働きを阻害することが示唆された。CARFは01 site切断後の監視において働くXRN2には相互作用できず、5'ETS-pre-rRNA fragmentsを分解するXRN2および01 site切断に働くXRN2には相互作用でき、その局在を変化させると推論される。

CARFがXRN2を核質に留めることから、CARFがpol IIの転写終結点にXRN2を留める可能性が考えられる。本研究においてCARFがXRN2と相互作用することが明らかになったことから、XRN2とARFがCARFを相互作用因子として競合すると推論される。ARFはCARFを介さない経路においてもがん化抑制に働くことから、CARFから遊離したARFもがん化抑制能を発揮でき、がん化抑制が促進すると推論される。あわせて、CARFがXRN2のpre-rRNAプロセッシングにおける働きを阻害することによりリボソーム生合成が低下し、細胞増殖が低下する可能性も考えられ、細胞の増殖がさらに抑制されると考えられる。今後、本研究で明らかになったCARFとXRN2の相互作用や生理機能に関して更なる研究が進み、新規抗がん剤が開発されることを待ち望みたい。